植物病理學會刊　13: 97-106, 2004

齒舌蘭輪斑病毒台灣系統基因序列譯讀與分析

王惠亮[1,3]　王志農[1]　張清安[2]

1 高雄市 國立高雄師範大學 生物科學研究所
2 台中縣 行政院農業委員會 農業試驗所植病組
3 聯絡作者：電子郵件hlwang@nknucc.nknu.edu.tw，傳眞+886-7-7169030
接受日期：中華民國 93 年 4 月25 日

摘　要

王惠亮、王志農、張清安. 2004. 齒舌蘭輪斑病毒台灣系統基因序列譯讀與分析. 植病會刊13: 97-106.

齒舌蘭輪斑病毒 (*Odontoglossum ringspot virus*, ORSV)，是感染蘭科植物最重要的病毒之一，在分類上屬於菸草嵌紋病毒屬 (genus *Tobamovirus*)，是一種長桿狀顆粒病毒，其顆粒大小約為長度300 nm，寬度18 nm，顆粒中軸可清楚分辨有溝狀構造。在地理的分佈上遍佈溫帶及熱帶地區的非洲、亞洲、澳洲、歐洲、北美及南美洲。本研究完成選殖與譯讀齒舌蘭輪斑病毒台灣系統(ORSV-TW) 的全長度核苷酸和胺基酸序列，並與已報告之ORSV-S1 (新加坡)、ORSV-Cy1 (日本)、ORSV-Cy (韓國) 及ORSV-U (美國) 等四個系統作全長度核苷酸和胺基酸序列進行比對與分析。ORSV-TW 全長度核苷酸序列為6612 個核苷酸(accession number：AY571290)，其中126/183 kDa RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) 基因共3336/4839 個核苷酸，可分別轉譯成1112 個胺基酸，分子量為126 kDa 之replicase protein 和1612 個胺基酸，分子量為183 kDa 之readthrough protein、movement protein (MP) 基因共912 個核苷酸，可轉譯成303 個胺基酸，分子量為33 kDa、coat protein 基因 (CP) 共477 個核苷酸，可轉譯成158 個胺基酸，分子量為18 kDa、5' 端非轉譯區63 個核苷酸和3' 端非轉譯區414 個核苷酸。經與國外報告ORSV 核苷酸序列相同度及胺基酸序列相似度比對結果顯示，五個系統間各基因的比較結果都達到96 % 以上，顯示五者具高同源性，種內的遺傳歧異度相當低，為同種病毒之不同系統。

關鍵詞：齒舌蘭輪斑病毒、開放轉譯架構、核苷酸序列

緒　言

蘭花屬於蘭科植物(Orchidaceae) 是國內重要的觀賞花卉之一。其種類繁多，估計有800-900 屬25,000 種以上，是植物界中僅次豆科及菊科的大家族。全世界發現之蘭花病毒記載至少有25 種，國內已發現的有喜姆比蘭嵌紋病毒 (*Cymbidium mosaic virus*; CymMV)、齒舌蘭輪斑病毒 (*Odontoglossum ringspot virus*; ORSV)、胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*; CMV) 以及一種未定名的槍彈形病毒 (*Rhabdovirus*) 等4 種，在這4 種之中，為害最普遍的屬CymMV 和ORSV 兩種。ORSV 被公認為最困擾蘭花栽培之病毒之一，其性質較CyMV 更為穩定頑劣，因此防治上之困難度也較高。蘭花組織培養程序中受ORSV 污染之情況也較CyMV 嚴重，因此隨蘭花種苗傳播之情況極為普遍，國際間此病毒相互交流之機會亦高[4]。ORSV 最早是由Jensen & Gold[11]1951 年在美國*Odontoglossum grande* 上所發現，病徵是輪斑 (ringspot)，斑紋 (mottle)，嵌紋 (mosaic)，花色條斑 (color breaking)，黃化條紋(chlorotic streak)，甚至壞疽型 (necrosis) 病徵均有記錄[4, 17]。據以前文獻認為ORSV 應為煙草嵌紋病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV) 之蘭花系統 (TMV-O)，但也有相當多之學者證實ORSV 為獨立之tobamovirus 而非屬於TMV 之一個系統[7, 11, 17]。最近日本學者Isomura 等更提出核酸序列分析之證據，支持ORSV 乃異於 TMV 之獨立病毒[9]。目前學界普遍認ORSV應是發生於蘭花上最普遍之 tobamovirus 病毒[4, 9]。

ORSV 是煙草嵌紋病毒屬 (*Tobamovirus*) 之一員，病毒形態為直硬桿狀顆粒，長度300 nm，寬度18 nm，顆粒中軸可清楚分辨有溝狀構造。齒舌蘭輪斑病毒的基因體長約為6.6 kb，為單鏈正股 (ssRNA) RNA 病毒。它的第一個開放轉譯架構(ORF 1) 長約4.9 kb，可分別轉譯出兩個分子量約為126 kDa/183 kDa 的蛋白質分子。活性分析推測定

這個病毒蛋白質至少含三個功能性區間，蛋白質的 N 端區域具有 guanyltransferase 與 methyltransferase 活性(這兩個酵素活性與 mRNA 的 capping 有關)，中間區域具有 nucleoside triphosphatase 與RNA 5'-triphosphatase 活性和解螺旋酵素 (helicase) 具有將纏繞之雙股核酸(或形成二級結構之單股核酸)解開來的活性，在諸多生理流程中，如核酸的複製、重組、基因之轉錄、與轉譯等，核酸解螺旋酵素活性皆扮演重要的角色，一般相信 RNA 病毒在進行基因體複製的過程，亦需要RNA 解螺旋酵素的參與，才能完成完整的複製。C 端區域則具有 RNA polymerase 活性。推論這個蛋白質應該負責病毒基因體的複製與 RNA 5' 端的 capping 反應，因此為病毒複製酵素。病毒基因體 5' 端具有 cap 的構造可能是 ($m^7G_{ppp}G$)，3' 端形成不包含 polyA 在內的偽結 (pseudo knot) 類似 t-RNA 結構，能接受組胺酸，病毒整個基因組中存在四個開放轉譯架構 (open reading frames, ORFs)，分別為RdRp (RNA-dependent RNA polymerase)、MP (movement protein) 及 CP (coat protein) 基因，加上5' 端非轉譯區(5' non-translated region, 5' NTR) 和 3' 端非轉譯區 (3' non-translated region, 3' NTR)。ORSV 3' NTR 核苷酸序列之長度是 genus *Tobamovirus* 病毒中最長的，且最容易與其他 tobamoviruses 區別[10]。5' 端第一個ORF 轉譯 126 kDa 蛋白，終止密碼為TAG，可以被通讀為轉譯一個更大分子量為 181 kDa[15]和 183 kDa 的蛋白[7, 8, 10]，這個通讀蛋白的最後 95 個核苷酸與第三個ORF 重疊，第三個 ORF 轉譯 34 kDa[15]、33 kDa[7]和31 kDa[8, 10]移動蛋白，其功能與病毒基因體在感染植株體內進行移動有關。第四個 ORF 轉譯 18 kDa，外鞘蛋白其功能可保護病毒基因體且與感染植株體細胞膜受體有關[7, 10, 15]。

比較不同系統ORSV 之RdRp、MP、CP 基因核苷酸與胺基酸序列及 3' NTR 之核苷酸序列，可作為判斷遺傳上歧異度之參考，CP 基因及 3' NTR 之核苷酸序列更是在病毒分類上具有參考意義[2, 3, 12]。本實驗的目的在於萃取 ORSV-TW 病毒RNA，設計專一性的引子，經由RT-PCR 增幅後，譯讀全長度核苷酸序列，分析病毒基因，並與已報告之新加坡系統 ORSV-S1 (Singapore strain Type 1；accession number：U34586)[7]；日本系統 ORSV-Cy1 (Japan strain Type 1；accession number：S83257)[10]；韓國系統 ORSV-Cy (Korea strain Type 1；accession number：NC_001728)[15]及美國系統ORSV-U (America strain；accession number：ORU89894)[8]作全長度與各基因之核苷酸和胺基酸序列比較，分析此五種同屬同種不同系統病毒基因遺傳上之歧異程度。

材料與方法

齒舌蘭輪斑病毒之來源

本研究中所使用之齒舌蘭輪斑病毒 (*Odontoglossum ringsport virus*；ORSV) 係由國蘭病株經由奎藜 (*Chenopodium quinoa*) 三次單斑分離後，接種至菸草 (*Nicotiana benthamiana*)，並經 CyMV、ORSV 和CMV 抗血清檢定後，確定感染齒舌蘭輪斑病毒，將呈現嵌紋病徵之病葉研磨成汁，接種於健康之菸草幼苗葉片上，待其病徵表現後，將病毒純化備用[6]。

病毒核酸之萃取與電泳分析

病毒核酸之萃取：取本實驗室已純化之 ORSV 病毒 300 μl (0.7 μg/ μl)加300 μl 之之解離緩衝液(digestion buffer) 振盪使其均勻後，加入 1.5 μl 之proteinase K (10 μg/ml) 並置於37℃ 水浴槽中，水浴30 分鐘後加入同體積之 phenol/ chloroform/ isoamyl alcohol (25：24：1, pH 5.2)之混合液，並劇烈震盪使其乳化後，於室溫下以14,000 rpm (Jouan, A14, Italy) 離心10 分鐘。取上層清液，並分別加入同體積之 chloroform：isoamyl alcohol (24：1) 溶液，劇烈震盪後，於室溫下以 14,000 rpm 離心 5 分鐘；取上層清液，分別加入 1/10 體積之3 M sodium acetate (pH 5.2) 及 2 倍體積之 100 % 酒精，進行沉降，將沉澱物真空乾燥 (Eyela CVE-100 Centrifugal Vaporizer, Japan)，再回溶於以焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate；DEPC) 處理過的無菌水中，病毒RNA 濃度調整為1 μg/ μl，最後置於 -70 ℃ 下保存之[3]。

病毒核酸電泳膠體分析：為確定所萃取出之病毒 RNA之完整性，且估算其分子量大小，乃將萃取所得之病毒RNA進行水平膠體電泳以分析之。取4 μl 乙二醛承載緩衝液(glyoxal loading buffer) 和2 μl 萃取的病毒RNA (1 μg/ μl) 混合均勻後，經由1.5 % 洋菜水平膠體及0.5 X TAE 緩衝系統，進行水平膠體電泳分析，經溴化乙錠 (ethidium bromide) 染色後，與RNA markers (0.24-9.5 kb, BRL) 比對，估算ORSV-TW 病毒RNA 分子量大小[3]。

病毒基因核苷酸序列之選殖

由 3' NTR 序列開始到至 5' NTR 序列，其中包括 ORSV-TW 整個基因組中RdRp 基因之replicase protein 和 readthrough protein、MP 和CP 基因等四個開放轉譯架構。ORSV-TW 基因序列選殖所用引子之設計，是以ORSV-S1 (accession number: U34586)[7]之病毒核苷酸序列作為參考序列，再視核苷酸序列之特性約 500-1000 bp 大小之間設計出一組引子(表一)進行 RT-PCR。各組引子間所涵蓋之基因序列有重複序列(約 50-100 mers) 以便用於定序、比對及組合序列。

反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)，將萃取的 ORSV-TW 的RNA 定量後，取1 μl (0.1 μg) 配合所設計之引子

對，利用 QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN, USA) 進行 RT-PCR 反應，增幅條件依使用說明指示進行，增幅作用於自動溫度循環控制器 GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer, USA) 中進行。

病毒 5' NTR 核苷酸序列之選殖

利用 SMARTTM RACE cDNA Amplication Kit (Clontech, USA) 進行反應，合成包含 5' NTR 序列之 cDNA。以 3' 端引子 ORSV-9R (表一)，合成第一股 cDNA 包含 5' NTR 序列。第一股 cDNA 之增幅條件依使用說明指示進行。再以包含 5' NTR 之第一股 cDNA 作模板，兩端引子 ORSV-R10 和 Smart 2A (表一)進行 PCR 增幅反應 (TaKaRa, Japan)。

病毒 3' NTR 核苷酸序列之選殖

病毒核酸 3' 端連結 poly(A)：取不具有 poly(A) 尾端之ORSV-TW 病毒 RNA 1 μl進行 poly(A) 連結，利用 3' End Labeling Kit (Boehringer Mannheim, USA) 將 poly(A) 連結到ORSV-TW 病毒 RNA 之尾端，以便合成包含完整之3' NTR 之第一股cDNA。

第一股 cDNA 之合成：取上述完成含 poly(A) 之 ORSV-TW RNA ，配合引子 polyT1 (表一)，利用 SuperScript™ III RNase H-Transcriptase Kit (Invitrogen, USA) 合成第一股包含完整 3' NTR 之 cDNA。

聚合酶連鎖反應 (PCR)：將第一股 cDNA 作為模板，配合兩端引子 ORSV-R3NF 和 PolyT2 (表一)進行 PCR 增幅反應(TaKaRa, Japan)。

RT-PCR 和 PCR 產物之電泳膠體分析

將上述之產物經由 1.5 % 洋菜水平膠體及 0.5X TAE 緩衝系統進行電泳分析，經 ethidium bromide 染色後與 DNA markers (0.05-2 kb, Novagen, Germany;0.1-1.5 kb, Promega, USA) 比對，並估算其產物分子量大小。

病毒核苷酸序列之譯讀

序列之譯讀是根據 Sanger (1977) 之雙股去氧核糖核酸

表一、齒舌蘭輪斑病毒台灣系統之RT-PCR 和PCR 基因序列合成引子序列表

Table 1. Synthetic primers used in RT-PCR and PCR reactions for amplifying viral genes of ORSV-TW strain

Primers	sense/antisense (+/-)	Corresponding position[1]	Sequences			Target gene
ORSV-F1	+	5911-5930	5'	CTGCAGGCGCTGGTTACTTC	3'	CP
ORSV-R1	-	6589-6609	5'	TGGGCCTCTACCCGAGGTAA	3'	CP
ORSV-F2	+	5251-5270	5'	TACAGTGTCACCACTGCCGA	3'	MP, CP
ORSV-R2	-	6011-6030	5'	TCTGCGGATTTTCCACCTCG	3'	MP
ORSV-F3	+	4611-4630	5'	CATCATGACAGAGTTGCCAT	3'	126/183 kDa RdRp, MP
ORSV-R3	-	5391-5410	5'	TCTTCTCTCTCAGTCCGAGT	3'	126/183 kDa RdRp, MP
ORSV-F4	+	4117-4136	5'	TTTACACCCGGAAAACGCCC	3'	126/183 kDa RdRp
ORSV-R4	-	4786-4805	5'	TACTGCGGTCTTGTGGACCT	3'	126/183 kDa RdRp
ORSV-F5	+	3381-3400	5'	GTCGATGCCGGGATCTTATA	3'	126/183 kDa RdRp
ORSV-R5	-	4163-4182	5'	TTGGCACCGTCGAATCCAAA	3'	126/183 kDa RdRp
ORSV-R4-5	-	4290-4309	5'	CTTCCTATGTCCCTGTTTCC	3'	126/183 kDa RdRp
ORSV-F6	+	2642-2661	5'	GAGAGCTAATAAGTCTGGAC	3'	126/183 kDa RdRp
ORSV-R6	-	3443-3462	5'	CAGATTTAGGACATGGTACG	3'	126/183 kDa RdRp
ORSV-F7	+	2016-2035	5'	CCAAAGCAAAGCTACGGTGA	3'	126/183 kDa RdRp
ORSV-R7	-	2793-2812	5'	TCACGACAATGGGACAATGC	3'	126/183 KDa RdRp
ORSV-F8	+	1201-1230	5'	CCGTCACTTCAGGAAAGATG	3'	126/183 kDa RdRp
ORSV-R8	-	1981-2000	5'	GATGCGGACAGGTAATCCAT	3'	126/183 kDa RdRp
ORSV-F9	+	451-470	5'	TTGACATTCGCGATGTGGCT	3'	126/183 kDa RdRp
ORSV-R9	-	1381-1340	5'	CACAGACTTGTCTACATCCC	3'	126/183 kDa RdRp, 5'NTR
Smart2A[2]	+		5'	CAGTGGTATCAACGCAGAGT	3'	126/183 kDa RdRp, 5'NTR
ORSV-R10	-	539-559	5'	GCTGATTGCTGAAAAACCGG	3'	126/183 kDa RdRp, 5'NTR
PolyT1	-		5'	TGGTCATGTAGACAGCAGAC TTTTTTTTTTTTTTT	3'	3'NTR
ORSV-3NF	+	6338-6357	5'	TCCCGTTGTGTACACGATAG	3'	3'NTR
PolyT2[3]			5'	TGGTCATGTAGACAGCAGAC	3'	3'NTR

[1] Corresponding positions referred to that of ORSV-S1(Acc. No. U34586).
[2] Sequence referred to Smart II oligo sequence (Clonteck, USA) and used for 5'-NTR amplification.
[3] Sequence referred to polyT1 and used for 3'-NTR amplification.

鏈終止 (dideoxy chain termination) 方法[16]，使用 ABI PRISMTM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 及 ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems，USA.) 核酸自動定序儀進行核苷酸序列之譯讀，再利用 Hitachi software DNASIS for Windows (version 2.1 DNASIS, Hitachi Software Engineering America Ltd. USA) 軟體分析系統的序列功能進一步合成核苷酸序列。

病毒基因序列與國外同種病毒之比較

將 ORSV-TW 整個基因組中所包含 126/183 kDa RdRp、MP、CP 等四個開放轉譯架構之基因序列，利用上述軟體分析系統的功能，分別進行 A、T、G、C 含量分析，轉譯成胺基酸序列，並與新加坡系統 ORSV-S1 (accession number: U34586)、日本系統 ORSV-Cy1 (accession number: S83257)；韓國系統 ORSV-Cy (accession number: NC_001728) 及美國系統 ORSV-U(accession number: ORU89894) 之RdRp/readthrough protein，RdRp/replicase，MP，CP 等四個開放轉譯架構之基因核苷酸和胺基酸序列及 5' 至3' NTR 全長度核苷酸序列，進行多重序列比對 (multiple sequence)，分析不同系統間核苷酸序列相同度、胺基酸序列相似度和5' 和3' NTR核苷酸序列的相同度及親緣關係。

結 果

病毒核酸之萃取及電泳膠體分析

齒舌蘭輪斑病毒台灣系統ORSV-TW 之 RNA 分子經萃取後，以 1.5 % 洋菜水平膠體電泳分析之結果顯示，電泳僅出現單一分子片段，該片段與 0.24-9.5 kb 之 RNA markers (Sigma，USA) 比對之後，估計其RNA 分子量大小約爲6.6 kb。

病毒基因核苷酸序列之電泳膠體分析

從 3' 至 5' NTR 核苷酸序列，使用 QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN , USA)，並以十對引子進行 RT-PCR 反應以增幅出特定大小之片段，並將產物進行 1.5 % 洋菜水平膠體電泳分析，經與 0.05-2 kb (Novagen, Germany) 或 0.1-1.5 kb (Promega, USA) DNA makers 比對，其產物分別約爲 0.6、0.8、0.8、0.7、0.8、0.8、0.8、0.7、0.9 和0.9 kb。

病毒 5' NTR 核苷酸序列之電泳膠體分析

ORSV-TW RNA 經 SMARTTM RACE cDNA Amplication Kit 以ORSV-R9 引子反轉錄爲第一股cDNA，再使用第一股 cDNA 爲模板，利用 ORSV-R10 與 Smart2A 一組引子(表一)，進行PCR 增幅反應，並將產物進行 1.2 % 膠體電泳分析，經與 0.1-1.5 kb DNA markers (Promega, USA) 比對分子大小，其產物約爲0.6 kb。

病毒3' NTR核苷酸序列之電泳膠體分析

ORSV-TW RNA 經 poly(A) 連結後，再經 PowerScript^{TM} Reverse Transcriptase 以polyT1 引子進行反轉錄爲第一股cDNA。使用上述之第一股cDNA 爲模板，再使用ORSV-3NF 與polyT2 一組引子(表一)，分別進行 PCR 增幅反應，並將產物進行 1.2 % 膠體電泳分析，經與 0.1-1.5 kb DNA markers (Promega, USA) 比對分子大小，其產物約爲0.3 kb。

表二、齒舌蘭輪斑病毒各系統之基因序列核苷酸與胺基酸數目之比較

Table 2. Lengths in nucleotide (nt) and amino acid (aa) of genomic regions of *Odontoglossum ringsport virus* (ORSV)

		Genomic regions[2]								
Fragments	Strains[1]	Full-length	5'-NTR	RdRp readthrough protein	kDa	RdRp replicase 126 kDa	MP	kDa	CP 18 kDa	3'-NTR
nt	TW	6612	63	4839		3339	912		477	414
	S1	6609	62	4839		3339	912		477	412
	Cy1	6611	62	4839		3339	840		477	414
	Cy	6611	69	4788		3339	912		477	414
	U	6618	62	4839		3339	840		477	414
aa	TW			1612	183	1112	303	33	158	
	S1			1612	183	1112	303	33	158	
	Cy1			1612	183	1112	280	31	158	
	Cy			1595	181	1112	303	34	158	
	U			1612	183	1112	280	31	158	

1 TW: Taiwan strain (Acc. No. AY571290); S1: Singapore strain (Acc. No. U34586); Cy1: Japan strain (Acc. No. S83257); Cy: Korea strain (Acc. No. NC_001728); U: America strain (Acc. No. U89894).

2 NTR: non-translated region; RdRp: RNA-dependent RNA polymerase; MP: movement protein; CP: coat protein.

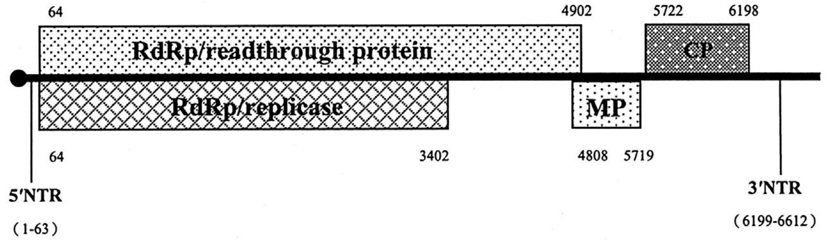
```
                                                            GGT    3
ATTGTTCGATTACTACAATCACAACAAACAATTACAACAAAATTCACAATTCACATTAAC   63
ATGGCACACTTCCAACAAACAATGAACAACAAAGTTATTGAGGCTGGTATGGGCAGAAAC  123
 M  A  H  F  Q  Q  T  M  N  N  K  V  I  E  A  G  M  G  R  N    20
 ↑__ readthrough protein 與 replicase protein
AGCCTCATTAACGATTTGGCTCAGAGACGTGTTTACGATAACGCTGTCGAAGAGTTAAAC  183
 S  L  I  N  D  L  A  Q  R  R  V  Y  D  N  A  V  E  E  L  N    40
CACCGTTCTAGACGCCCAAAGGTTAACTTTTCCAAGGTCATTTCTCAGGAACAGATTATT  243
 H  R  S  R  R  P  K  V  N  F  S  K  V  I  S  Q  E  Q  I  I    60
CAAGCTACTAATGCGTACCCTGAGTTTGAAATCACCTTTTACAACACTCAACTCGCTGTC  303
 Q  A  T  N  A  Y  P  E  F  E  I  T  F  Y  N  T  Q  L  A  V    80
CACTCGATGGCGGGAGGTCTTCGAGCACTCGAGCTCGAGTATCTTATGATGCAAATCCCA  363
 H  S  M  A  G  G  L  R  A  L  E  L  E  Y  L  M  M  Q  I  P   100
TTTGGTTCTGTTACGTATGACATCGGGGGAAACTTTTCAGCGCACTTATATAAAGGACGA  423
 F  G  S  V  T  Y  D  I  G  G  N  F  S  A  H  L  Y  K  G  R   120
GATTACGTCCATTGCTGTATGCCTAATCTTGACATTCGCGATGTGGCTCGTCACATCAAT  483
 D  Y  V  H  C  C  M  P  N  L  D  I  R  D  V  A  R  H  I  N   140
CAACAAGATACTGTTTCTACTTATCTGGCTAGGCTCGAGAGAAGCAAGAGGGGTCTTCCG  543
 Q  Q  D  T  V  S  T  Y  L  A  R  L  E  R  S  K  R  G  L  P   160
GTTTTTCAGCAATCAGCTTTTAATAAATATATGAATGACCCTGATGCTGTGTGCTGCGAT  603
 V  F  Q  Q  S  A  F  N  K  Y  M  N  D  P  D  A  V  C  C  D   180
AAAAGGTTTCAAGACTGTTCTTACTCCGTTGATCTTCCGGGAAAAACATACGCTGTGGCG  663
 K  R  F  Q  D  C  S  Y  S  V  D  L  P  G  K  T  Y  A  V  A   200
CTTCATAGTATCTATGATATTCCAGCGGATGAGTTCGGAGCTGCCTTATTACGAAAGGAT  723
 L  H  S  I  Y  D  I  P  A  D  E  F  G  A  A  L  L  R  K  D   220
GTTCACATATGTTATGCTGCTTTTCATTTTAGTGAGAATCTGCTTCTTGAGACTACGTCT  783
 V  H  I  C  Y  A  A  F  H  F  S  E  N  L  L  L  E  T  T  S   240
GCTCCGCTCGATGAGATTGGAGCGACGTTTTACAAGTCAGGGGATAGATTATCCTTTTTC  843
 A  P  L  D  E  I  G  A  T  F  Y  K  S  G  D  R  L  S  F  F   260
TTTCAAAATGAGAGCACATTGAATTATGAACATTCTTATAAAAACGTAATTAAATATGTT  903
 F  Q  N  E  S  T  L  N  Y  E  H  S  Y  K  N  V  I  K  Y  V   280
TGCAAGACTTTTTTCCCAGCTTCAAATAGGTTTGTCTACCATAAGGAATTTATGTGCACC  963
 C  K  T  F  F  P  A  S  N  R  F  V  Y  H  K  E  F  M  C  T   300
AGAGTTAACACATGGTTTTGTAAGTTCACCAAGGTAGATACTTATTTCCTTTTCCGAGGG 1023
 R  V  N  T  W  F  C  K  F  T  K  V  D  T  Y  F  L  F  R  G   320
GTGTATACTAGGGGAGAAGATTCTGAACAATTTTACACTGCTATGGATGAAGCATGGGAG 1083
 V  Y  T  R  G  E  D  S  E  Q  F  Y  T  A  M  D  E  A  W  E   340
TATAAGAAAACTTTGGCAATGCTTAATAGCGAAAGGACGATCTTTCGCGATCGCGCTGCG 1143
 Y  K  K  T  L  A  M  L  N  S  E  R  T  I  F  R  D  R  A  A   360
GTTAACTTTTGGTTTCCTAAAGTTAAGGATATGGTTATTGTGCCGCTTTTTGATGGTTCC 1203
 V  N  F  W  F  P  K  V  K  D  M  V  I  V  P  L  F  D  G  S   380
GTCACTTCAGGAAAGATGAAAAGAAGTGAAGTCATGGTTAACAAGGATTTTGTTTACACC 1263
 V  T  S  G  K  M  K  R  S  E  V  M  V  N  K  D  F  V  Y  T   400
GTTTTAAATCACATCCGTACCTATCAAGACAAAGCCTTGACGTATAAAAACGTTCTTTCC 1323
 V  L  N  H  I  R  T  Y  Q  D  K  A  L  T  Y  K  N  V  L  S   420
TTTGTCGAGTCAATTAGGTCTCGTGTGATTATTAATGGTGTGACTGCAAGATCTGAGTGG 1383
 F  V  E  S  I  R  S  R  V  I  I  N  G  V  T  A  R  S  E  W   440
GATGTAGACAAGTCTGTGTTACAGGCGTTATCTATGACTTTTCTTTTACAGACGAAGTTG 1443
 D  V  D  K  S  V  L  Q  A  L  S  M  T  F  L  L  Q  T  K  L   460
GCTGAAGCAAAAGATCAAGTCGTACTTAAAAAATTTCAAAAATTTGACGATACAGTTACT 1503
 A  E  A  K  D  Q  V  V  L  K  K  F  Q  K  F  D  D  T  V  T   480
AATCTTTTCTGGAAACAGATTAGTGATGCTGTAGGCGATCTCTTCCCGTCGATTAAGGAA 1563
 N  L  F  W  K  Q  I  S  D  A  V  G  D  L  F  P  S  I  K  E   500
AGGCTCATTAGCGGTGGGTTTGTAAAAGTTGCTGAGCAATCTTTACAAATTAAAACGCCT 1623
 R  L  I  S  G  G  F  V  K  V  A  E  Q  S  L  Q  I  K  T  P   520
GATGAGTATATCACCTTTGCAGATAAACTGGTTATGGAATATAAAGCAACTGAAGAGCTT 1683
 D  E  Y  I  T  F  A  D  K  L  V  M  E  Y  K  A  T  E  E  L   540
CAACATCTAGACATTAGTAAGCCTCTTGAGAGAGCCGAGAAATATTATAACGCTTTATCG 1743
 Q  H  L  D  I  S  K  P  L  E  R  A  E  K  Y  Y  N  A  L  S   560
GAACTATCGGTTCTCAAGGAATGTGACGAGTTTGATATAACGCAATTCAAGAATTTATGT 1803
 E  L  S  V  L  K  E  C  D  E  F  D  I  T  Q  F  K  N  L  C   580
GAAGAAAAGGACATTGATCCAGACGTCGTGGCGAAAGTGATCGTCGCCATCATGAAGAAC 1863
 E  E  K  D  I  D  P  D  V  V  A  K  V  I  V  A  I  M  K  N   600
GAACTCACACTGCCTTTTAAAAATCCAACGCCTGAAGCATTATCGGATGCTCTTTCACCG 1923
 E  L  T  L  P  F  K  N  P  T  P  E  A  L  S  D  A  L  S  P   620
```

```
TTACCCAAAGACTTGGATATGAGATTTGATCTGCTTAAATTAAGTACGTGTGCACCCTTT 1983
 L  P  K  D  L  D  M  R  F  D  L  L  K  L  S  T  C  A  P  F   640
CCAAGCGTTAAAACTTTAGATAGTGGTTTATTACCAAAGCAAAGCTACGGTGACGAAAGA 2043
 P  S  V  K  T  L  D  S  G  L  L  P  K  Q  S  Y  G  D  E  R   660
CAATTTGAGAGTCAATCTGTCGTGTCTGTATCTGATTTTCATCTTAAGAGCGTCGAGTCA 2103
 Q  F  E  S  Q  S  V  V  S  V  S  D  F  H  L  K  S  V  E  S   680
GTAAAAATGAAAAACATGTCGTCAGCGGTCTACACAGGTCCCCTCAAAGTTCAACAGATG 2163
 V  K  M  K  N  M  S  S  A  V  Y  T  G  P  L  K  V  Q  Q  M   700
AAGAACTATATGGATTACCTGTCCGCATCGATTTCGGCTACTGTTTCAAATTTATGCAAG 2223
 K  N  Y  M  D  Y  L  S  A  S  I  S  A  T  V  S  N  L  C  K   720
GTGCTAAAGGATGTCTATGGTGCCGACCCAGAGTCTGCAGAAAAGTCTGGAGTCTACGAT 2283
 V  L  K  D  V  Y  G  A  D  P  E  S  A  E  K  S  G  V  Y  D   740
GTAGTGAAAGGCAAATGGTTATTAAAACCAAAGGATAAATGTCACGCTTGGGGTGTTGCC 2343
 V  V  K  G  K  W  L  L  K  P  K  D  K  C  H  A  W  G  V  A   760
GAACTTAACAATGGCGAGAAAGTCATCGTATTACTCGAATGGGCTGATGGATTCCCTATT 2403
 E  L  N  N  G  E  K  V  I  V  L  L  E  W  A  D  G  F  P  I   780
TGTGGTGATTGGCGACGAGTGGCCGTCTCTTCAGATTCCCTTATTTATTCAGATATGGGA 2463
 C  G  D  W  R  R  V  A  V  S  S  D  S  L  I  Y  S  D  M  G   800
AAACTTCAGACGTTGTTAAGCTGCTTAAAGGACGGTGAGCCCGTACCTTCGGATGCGAAA 2523
 K  L  Q  T  L  L  S  C  L  K  D  G  E  P  V  P  S  D  A  K   820
GTCACGTTGGTAGATGGCGTTCCTGGTTGTGGAAAAACAAAGGAAATTCTTGAAACTGTG 2583
 V  T  L  V  D  G  V  P  G  C  G  K  T  K  E  I  L  E  T  V   840
AATTTTGATGAGGACTTAATACTTGTTCCTGGTAAAGAAGCTTGTAAAATGATTATCAAG 2643
 N  F  D  E  D  L  I  L  V  P  G  K  E  A  C  K  M  I  I  K   860
AGAGCCAATAAGTCTGGACATGTAAGAGCGACAAAGGATAATGTAAGAACTGTGGATTCG 2703
 R  A  N  K  S  G  H  V  R  A  T  K  D  N  V  R  T  V  D  S   880
TTCTTAATGCATCTGAAGCCTAAGACTTATAACAAACTGTTTATCGATGAAGGTTTGATG 2763
 F  L  M  H  L  K  P  K  T  Y  N  K  L  F  I  D  E  G  L  M   900
TTACATACTGGTTGTGTCAACTTTCTGATAGCATTGTCCCATTGTCGTGAGGCGATGGTT 2823
 L  H  T  G  C  V  N  F  L  I  A  L  S  H  C  R  E  A  M  V   920
TTTGGTGATACTGAACAAATTCCCTTTATAAACAGAGTGGCAAATTTCCCTTATCCGAAA 2883
 F  G  D  T  E  Q  I  P  F  I  N  R  V  A  N  F  P  Y  P  K   940
CATTTTGCTACACTTGTTTATGATCATAGGGAGGTTAGGAGGTTATCACTTAGATGCCCG 2943
 H  F  A  T  L  V  Y  D  H  R  E  V  R  R  L  S  L  R  C  P   960
GCAGATGTTACGCATTTTATGAACTCCAAATATGACGGGAAAGTTTTATGTACGAGTGAT 3003
 A  D  V  T  H  F  M  N  S  K  Y  D  G  K  V  L  C  T  S  D   980
GTGATTCGCTCAGTTGATGCTGAAGTGGTTAGAGGGAAAGGGGTTTTTAACCCGAAAAGC 3063
 V  I  R  S  V  D  A  E  V  V  R  G  K  G  V  F  N  P  K  S  1000
AAACCGCTTAAAGGGAAAATTATCACCTTCACTCAAAGTGACAAAGCCGAACTGAAGGAG 3123
 K  P  L  K  G  K  I  I  T  F  T  Q  S  D  K  A  E  L  K  E  1020
CGTGGTTATGAAGAAGTTTCAACTTTTGGTGAAGTTAACACCGTACACGAAATCCAAGGT 3183
 R  G  Y  E  E  V  S  T  F  G  E  V  N  T  V  H  E  I  Q  G  1040
GAGACCTTTGAAGACGTATCGGTTGTTCGTTTGACACCAACTCCATTGGAGCTTATATCA 3243
 E  T  F  E  D  V  S  V  V  R  L  T  P  T  P  L  E  L  I  S  1060
AAGAGTTCACCGCACGTTCTTGTTGCATTGACAAGACATACTAAAAGCTTCAAATATTAC 3303
 K  S  S  P  H  V  L  V  A  L  T  R  H  T  K  S  F  K  Y  Y  1080
TCTGTGGTTCTCGATCCTCTCGTCAAAGTTTGCTCTGATTTAAGCAAGGTGTCAGACTTT 3363
 S  V  V  L  D  P  L  V  K  V  C  S  D  L  S  K  V  S  D  F  1100
ATACTGGATATGTATAAGGTCGATGCCGGGATCTTATAGCAATTACAGGTAGGGAGTATC 3423
 I  L  D  M  Y  K  V  D  A  G  I  L  *  Q  L  Q  V  G  S  I  1120
                replicase protein __↑
TTCAAAGGCGAAAATCTATTCGTACCATGTCCTAAATCTGGTTATATTTCTGATATGCAA 3483
 F  K  G  E  N  L  F  V  P  C  P  K  S  G  Y  I  S  D  M  Q  1140
TTTTATTATGACACTTTGTTACCTGGAAACAGCACTATTTTAAACGAGTATGATGCAGTG 3543
 F  Y  Y  D  T  L  L  P  G  N  S  T  I  L  N  E  Y  D  A  V  1160
ACTATGAATCTTCGTGAAAATAATCTTAATGTCAAGGATTGCACGATAGATTTTTCTAAA 3603
 T  M  N  L  R  E  N  N  L  N  V  K  D  C  T  I  D  F  S  K  1180
TCTGTTAGTGTCCCGAGACAACAACAAGAGTTTTTCACACCAGTCATTCGAACTGCTGCT 3663
 S  V  S  V  P  R  Q  Q  Q  E  F  F  T  P  V  I  R  T  A  A  1200
GAACGTCCACGTAGTGCTGGTCTCCTTGAAAACCTTGTGGCAATGATAAAAAGAAATTTT 3723
 E  R  P  R  S  A  G  L  L  E  N  L  V  A  M  I  K  R  N  F  1220
AACTCTCCAGATTTAACGGGTATATTAGATATTGAAGATACTGCCGAACTTGTAGTTAAT 3783
 N  S  P  D  L  T  G  I  L  D  I  E  D  T  A  E  L  V  V  N  1240
AAGTTTTGGGATGCTTACATTATTGACGAACTTTCTGGTGGAAATGTTACACCGATGACT 3843
```

```
AAGTTTTGGGATGCTTACATTATTGACGAACTTTCTGGTGGAAATGTTACACCGATGACT 3843
 K  F  W  D  A  Y  I  I  D  E  L  S  G  G  N  V  T  P  M  T 1260
TCAGATGCCTTTCACAGGTGGATGGCTAAGCAGGAGAAAAGTACTATTGGTCAATTAGCT 3903
 S  D  A  F  H  R  W  M  A  K  Q  E  K  S  T  I  G  Q  L  A 1280
GATTTTGACTTTGTTGATTTACCCGCTATTGATCAATACAAACATATGATTAAGGCGCAA 3963
 D  F  D  F  V  D  L  P  A  I  D  Q  Y  K  H  M  I  K  A  Q 1300
CCTAAACAGAAGCTTGATCTCAGTCCTCAAGATGAGTATGCTGCACTTCAGACTATTGTT 4023
 P  K  Q  K  L  D  L  S  P  Q  D  E  Y  A  A  L  Q  T  I  V 1320
TATCACTCAAAGCAGATAAATGCAATTTTCGGTCCTCTTTTTTCCGAATTAACTAGACAG 4083
 Y  H  S  K  Q  I  N  A  I  F  G  P  L  F  S  E  L  T  R  Q 1340
CTTTTAGAGAGGATAGACAGTAGCAAATTTTTGTTTTACACCCGGAAAACGCCCGAACAG 4143
 L  L  E  R  I  D  S  S  K  F  L  F  Y  T  R  K  T  P  E  Q 1360
ATTGAAGAGTTTTTCTCAGATTTGGATTCGACGGTGCCAATGGAAGTTCTAGAGTTAGAC 4203
 I  E  E  F  F  S  D  L  D  S  T  V  P  M  E  V  L  E  L  D 1380
ATTTCAAAGTATGACAAATCCCAGAACGAATTCCATTGTGCTGTTGAGTACTTGATTTGG 4263
 I  S  K  Y  D  K  S  Q  N  E  F  H  C  A  V  E  Y  L  I  W 1400
GAGAAACTTGGTCTTAATGGCTTTCTCGAAGAAGTTTGGAAACAGGGACATAGGAAGACA 4323
 E  K  L  G  L  N  G  F  L  E  E  V  W  K  Q  G  H  R  K  T 1420
TCCTTGAAGGATTACACCGCAGGAATAAAGACTTGTTTATGGTATCAAAGGAAAAGCGGA 4383
 S  L  K  D  Y  T  A  G  I  K  T  C  L  W  Y  Q  R  K  S  G 1440
GATGTAACTACATTTATTGGCAATACAGTTATTATAGCTGCTTGTCTTGCGTCGATGATA 4443
 D  V  T  T  F  I  G  N  T  V  I  I  A  A  C  L  A  S  M  I 1460
CCTATGGATAAGGTAATTAAAGCTGCGTTTTGTGGAGATGATAGTATTCTATACATTCCA 4503
 P  M  D  K  V  I  K  A  A  F  C  G  D  D  S  I  L  Y  I  P 1480
AAGGGACTTGATCTTCCTGATATCCAATCTGGAGCGAATTTGATGTGGAACTTCGAGGCA 4563
 K  G  L  D  L  P  D  I  Q  S  G  A  N  L  M  W  N  F  E  A 1500
AAATTATATCGTAAGCGTTACGGATATTTTTGCGGAAGGTATATTATTCATCATGACAGA 4623
 K  L  Y  R  K  R  Y  G  Y  F  C  G  R  Y  I  I  H  H  D  R 1520
GGTGCCATTGTGTATTACGACCCTCTTAAATTAATTTCTAAGTTAGGTTGTAAACACATC 4683
 G  A  I  V  Y  Y  D  P  L  K  L  I  S  K  L  G  C  K  H  I 1540
AAATCTTTGGATCATTTGGAAGAATTTAGAATCTCGCTGTGTGACGTAAGCTCTTCTTTA 4743
 K  S  L  D  H  L  E  E  F  R  I  S  L  C  D  V  S  S  S  L 1560
AATAATTGTGCGTATTTTGGTCAATTGAATGATGCAATTGCTGAGGTCCACAAGACCGCA 4803
 N  N  C  A  Y  F  G  Q  L  N  D  A  I  A  E  V  H  K  T  A 1580
GTAAATGGGTCGTTTGCGTTTTGTAGTATTGTTAAGTATCTTTCCGATAAAAACCTTTTC 4863
 V  N  G  S  F  A  F  C  S  I  V  K  Y  L  S  D  K  N  L  F 1600
MP→M  G  R  L  R  F  V  V  L  L  S  I  F  P  I  K  T  F  S   20
AGAACCTTGTTCTACAATGGCTCTAGTACTAAGGGATAGCATCAAAATCTCTGAATTTAT 4923
 R  T  L  F  Y  N  G  S  S  T  K  G  *    readthrough       1612
                                      ↑
                                      └─ protein
  E  P  C  S  T  M  A  L  V  L  R  D  S  I  K  I  S  E  F  I   40
TAATTTATCAGCCTCTGAAAAACTACTACCGTCAGCTCTAACGGCTGTCAAGTCGGTACG 4983
  N  L  S  A  S  E  K  L  L  P  S  A  L  T  A  V  K  S  V  R   60
TATTTCAAAGGTTGATAAAATTATAAGTTACGAGAATGATACTTTGTCTGATATTGATTT 5043
  I  S  K  V  D  K  I  I  S  Y  E  N  D  T  L  S  D  I  D  L   80
GCTTAAAGGTGTGAAGTTAGTAGAGAATGGGTATGTGTGCCTTGCCGGCCTCGTCGTCAC 5103
  L  K  G  V  K  L  V  E  N  G  Y  V  C  L  A  G  L  V  V  T  100
TGGTGAATGGAATTTGCCGGACAATTGCAAAGGTGGTGTGAGTATCTGTCTTGTAGACAA 5163
  G  E  W  N  L  P  D  N  C  K  G  G  V  S  I  C  L  V  D  K  120
ACGCATGAAAAGAGCTAATGAAGCAACACTTGGCTCTTATCATACATCTGCTTGCAAGAA 5223
  R  M  K  R  A  N  E  A  T  L  G  S  Y  H  T  S  A  C  K  K  140
GAGATTCACCTTTAAAATTATCCCGAACTACAGTGTCACCACTGCCGACGCTCTTAAAGG 5283
  R  F  T  F  K  I  I  P  N  Y  S  V  T  T  A  D  A  L  K  G  160
AATATGGCAAGTTATGACAAATATTAGAGGTGTGGAAATGGAAAAGGGTTTTTGCCCATT 5343
  W  Q  V  M  T  N  I  R  G  V  E  M  E  K  G  F  C  P  L  S  180
ATCTTTGGAGTTTGTTTCTATTTGCATAGTGTATTTAAATAATATAAAACTCGGACTGAG 5403
  I  L  E  F  V  S  I  C  I  V  Y  L  N  N  I  K  L  G  L  R  200
AGAGAAGATTTTGAACGTAACAGAAGGAGGGCCCACCGAACTTACTGAAGCAGTTGTTGA 5463
  E  K  I  L  N  V  T  E  G  G  P  T  E  L  T  E  A  V  V  D  220
TGAGTTCGTGGAGAAAGTTCCTATGGCTGCTAGGCTCAAGTCTTTTCGCTCTGTCAACAA 5523
  E  F  V  E  K  V  P  M  A  A  R  L  K  S  F  R  S  V  N  K  240
AAAGAAACCTAGTAACAGTTCTAAGTTTGTTAATGGAAAATCTAGACTTAATAGTCGTAA 5583
  K  K  P  S  N  S  S  K  F  V  N  G  K  S  R  L  N  S  R  N  260
TAAATTAAATTATGAAAATGGTGATAGTGATGTTGGTACTAGTGTTGTAGATGATATTGT 5643
  K  L  N  Y  E  N  G  D  S  D  V  G  T  S  V  V  D  D  I  V  280
GGTTAGTAATGGTGTTAGTGATATTCGTATTGATGATGATTGTGAGTCATTTGACGCACA 5703
  V  S  N  G  V  S  D  I  R  I  D  D  D  C  E  S  F  D  A  Q  300
ATCTGATTCGTATTGAATATGTCTTACACTATTACAGACCCGTCTAAGCTGGCTTATTTA 5763
  S  D  S  Y  *  ← MP                                          305
              CP → M  S  Y  T  I  T  D  P  S  K  L  A  Y  L   14
AGCTCGGCTTGGGCTGACCCCAATTCACTAATCAACCTTTGTACCAATTCTCTGGGTAAT 5823
 S  S  A  W  A  D  P  N  S  L  I  N  L  C  T  N  S  L  G  N   34
CAGTTCCAAACACAACAAGCTCGAACAACTGTTCAACAGCAGTTTGCTGATGTTTGGCAG 5883
 Q  F  Q  T  Q  Q  A  R  T  T  V  Q  Q  Q  F  A  D  V  W  Q   54
CCGGTTCCTACTTTGACCAGTAGGTTCCCTGCAGGCGCTGGTTACTTCAGAGTTTATCGC 5943
 P  V  P  T  L  T  S  R  F  P  A  G  A  G  Y  F  R  V  Y  R   74
TATGATCCTATATTAGATCCTTTAATAACTTTCTTAATGGGTACTTTTGATACTCGTAAT 6003
 Y  D  P  I  L  D  P  L  I  T  F  L  M  G  T  F  D  T  R  N   94
AGAATAATCGAGGTAGAAAATCCGCAGAATCCGACAACTACGGAAACATTAGATGCAACT 6063
 R  I  I  E  V  E  N  P  Q  N  P  T  T  T  E  T  L  D  A  T  114
CGTAGAGTTGATGATGCAACTGTAGCAATAAGATCTGCAATAAATAATCTATTAAATGAG 6123
 R  R  V  D  D  A  T  V  A  I  R  S  A  I  N  N  L  L  N  E  134
TTAGTTAGGGGAACTGGTATGTACAATCAAGTCTCATTTGAGACGATGTCTGGACTTACT 6183
 L  V  R  G  T  G  M  Y  N  Q  V  S  F  E  T  M  S  G  L  T  154
TGGACCTCTTCCTAATCATATTTAGGAAAATAACGTTGATAGTGTTGAACTATCCGTGGT 6243
 W  T  S  S  *  ←CP                                           159
GCATACGATAATGCATAGTGGTTATCCCTCCACTTAAATCGAAGGGTTTTTCACTGCGGA 6303
TATGTAGGTTTCCTACGGTGAATATAAAACTTATATCCCGTTGTGTACACGATAGTACAT 6363
AGTGTTTATCCCTCCACTTAAATCGAAGGGTTTTGTGTCACACGCGTGTAAGGAGTGGTC 6423
AACCTTACGACACATTTAAAATAATGCGTCCGTGGTGCATACGATAATGCATAGTGTTTG 6483
TCCCTCCACTTAAATCGAAGGGTTGTGTATATGGATCATGCGGATAAAGTTATACTGGTG 6453
CAGTATAACCCGTTATACACGTAAAATTATGAGGGATTCGAATTCCCCCTTACCTCGGGT 6603
AGAGGCCCA
```

圖一、齒舌蘭輪斑病毒台灣系統(ORSV-TW)全長度核苷酸及胺基酸序列(accession number：AY571290)

Fig.1. The full-length cDNA nucleotide and amino acid sequences of ORSV-TW RNA(accession number：AY571290). RdRp、MP and CP represent RNA-dependent RNA polymerase, movement protein, and coat protein, respectively. Arrows indicate the start and stop positions of each region.



圖二、齒舌蘭輪斑病毒台灣系統(ORSV-TW)之基因體示意圖

Fig. 2. Genome organization of *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV-TW). NTR、RdRp、MP and CP represent the non-translated region, RNA-dependent RNA polymerase, movement protein, and coat protein, respectively. Numbers indicate the start and stop positions of each region.

病毒RNA核苷酸序列之譯讀分析

ORSV-TW之RNA核苷酸序列譯讀分析，共完成3' 到5' NTR 全長度核苷酸序列，爲6612 個核苷酸，其中包含RdRp、MP 和CP 基因。5' NTR 共定序出63 個核苷酸，3' NTR 共有414 個核苷酸。在4 個開放轉譯架構中，RdRp 基因分別有4839 個核苷酸，轉譯成1612 個胺基酸的readthrough protein，末端停止密碼子(stop codon) 爲TAG，分子量爲183 kDa，和3339 個核苷酸，轉譯成1112 個胺基酸的replicase protein，末端停止密碼子爲TAG，分子量爲126 kDa；MP 基因共有912 個核苷酸，轉譯成303 個胺基酸，末端停止密碼子TGA，分子量爲33 kDa，CP 基因共有477 個核苷酸，產生158 個胺基酸，末端停止密碼子爲TAA，分子量爲18 kDa。而在RdRp 基因與MP 基因間共有95 個核苷酸重疊(overlapping)，MP與CP 基因間有2 個核苷酸間隙(intercistron) 是屬於非轉譯區核苷酸序列。齒舌蘭輪斑病毒台灣系統基因其核苷酸與胺基酸序列如圖一、二和表二所示。

病毒基因序列與國外同種病毒之比較

利用套裝軟體Hitachi software of the DNASIS for windows (version 2.1 DNASIS)，進行ORSV-S1、-Cy1、-Cy、-U和-TW 五個系統之RdRp/readthrough、RdRp /replicase、MP、CP 基因的核苷酸、胺基酸序列及5' 和3' NTR 核苷酸序列之分析比較。結果顯示(表三)五者之全長核苷酸序列相同度高達99.3-96.7 %；RdRp/readthrough 基因核苷酸相同度高達99.0-97.1 %，胺基酸相似度高達98.8-94.4 %；RdRp/replicase 基因核苷酸相同度高達99.0-96.9 %，胺基酸相似度高達99.1-94.3 %；MP 基因核苷酸相同度高達99.1-97.5 %，胺基酸相似度高達98.5-95.5 %；CP 基因核苷酸相同度高達100.0-97.6 %，胺基酸相似度高達99.3-94.9 %；5' NTR 核苷酸相同度則高達100-80.9 %；3' NTR 核苷酸相同度則高達99.8-95.3 %。CP 基因其核苷酸相同度，以ORSV-U 與ORSV-TW 系統相同度最高爲100 %，其次是ORSV-Cy1、ORSV-U 與ORSV-TW系統之相同度爲99.5%，ORSV-U 與ORSV-Cy 系統之相同度爲98.1 %，ORSV-Cy 與ORSV-S1 系統之相同度爲97.9 %，而又以ORSV-Cy1 與ORSV-Cy 系統之相同度 97.6 % 爲最低。若比較CP 基因胺基酸相似度，則以ORSV-TW、ORSV-U與ORSV-S1 系統之相似度最高爲99.3 %，其次是ORSV-S1、ORSV-Cy1、ORSV-U 與ORSV-TW 系統之相似度爲98.7 %，ORSV-Cy、ORSV-U 與ORSV-TW 系統之相似度爲95.5 %，而仍以ORSV-Cy1 與ORSV-Cy 系統之相似度 94.9 % 爲最低。若比較5' NTR 核苷酸相同度，以ORSV-S1 與ORSV-Cy1 系統之相同度最高達 100 %，而以ORSV-Cy1 and ORSV-Cy 系統之相同度較低爲 83.0 %。若比較3' NTR 核苷酸相同度仍以ORSV-TW 與ORSV-Cy1 系統之相同度最高達 99.2 %，而以ORSV-S1 和ORSV-Cy 系統之相同度較低爲95.3 %。

表三、齒舌蘭輪斑病毒台灣系統與其他四種不同系統的基因核苷酸相同度之比較

Table 3. Nucleotide identity (%) of the genes between ORSV-TW and other ORSV strains

Strains[1]	Full-length	RdRp readthrough protein	RdRp replicase	MP	CP
S1	98.4[2]	98.3	98.2	98.3	99.7
Cy1	99.3	99.0	99.0	99.1	99.5
Cy	96.9	97.5	96.9	98.3	98.1
U	98.6	98.9	98.6	97.5	100

[1] S1: Singapore strain (Acc. No. U34586); Cy1: Japan strain (Acc. No. S83257); Cy: Korea strain (Acc. No. NC_001728); U: America strain (Acc. No. U89894).

[2] Nucleotide identity (%).

若以ORSV-TW 系統分別與ORSV-S1、-Cy1、-Cy 和-U 四個系統比較，對全長核苷酸序列、RdRp/ Readthrough、RdRp/ Replicase、MP、CP 基因核苷酸與胺基酸序列和 5' 及 3' NTR 核苷酸序列而言，結果顯示ORSV-TW 與 -Cy1 系統之相同度均大於 -S1、-U 和 -Cy 等系統。

討　論

爲確定所萃取出之齒舌蘭輪斑病毒病毒系統之RNA 爲完整的RNA，故將萃取所得之RNA 進行水平膠體電泳分析。結果經過與0.2-10 kb 之RNA markers 比對之後，得知其分子量大小約爲6.6 kb，經過核苷酸序列分析ORSV-TW 共有 6612 個核苷酸。ORSV 爲目前已知的tobamoviruses RNA 的長度中最長，因其ORSV 之3' NTR 核苷酸序列，均較其他tobamoviruses 的長度多出約200 個[7]。ORSV-TW 之核苷酸序列分析，從3'到5' NTR 一共譯讀完成：5' NTR 有63 個核苷酸，比ORSV-S1、-Cy1、-U 之62 個核苷酸，多一個核苷酸[7, 8, 10]；而比-Cy 之69 個核苷酸少6 個核苷酸[15]，最值得注意的是ORSV-TW 5' 端的最前端比其他的四統個系統多一個G，而本研究5'端是利用SMART™ RACE cDNA Amplication Kit (Clontech , USA) 合成第一股cDNA，再將第一股cDNA 爲模板進行PCR增幅反應；而ORSV-Cy 和 -Cy1，則以病毒 RNA polyadenylated 再合成雙股的cDNA，黏合至 *Not*I-*Sal*I-linerarized Psport1，再轉殖至*E. coli* NM522，由於實驗方法有所差異，但是SMART™ RACE cDNA 合成第一股cDNA，依其反應機制，可以很成功地選殖完整5' 端的核苷酸序列，故ORSV-TW 最前端的一個G 應可採信。

ORSV-TW 之5' NTR 核苷酸序列共63 個，而CAA、ACA 等 triplet 分別重覆7 和8 次；ORSV-S1、-Cy1 和 -U之5' NTR 核苷酸均爲62 個，CAA、ACA 均分別重覆8 次；ORSV-Cy 之5' NTR 核苷酸序列共 69 個，CAA、ACA 均分別重覆 11 次，而以韓國 ORSV-Cy 的重覆次數最多，故其5' NTR 的核苷酸序列均較其他系統長，ACA triplet 在 TMV 病毒已證實是轉譯時的enhancer，且在 tobamovirus 裡5' NTR 的序列AUU 是 ribosome 的結合位[7, 10, 15]，在 ORSV-TW 具有六個AUU 之重複序列。同時ORSV-TW 在 5' NTR 含有4 個G-residues 數目在5 個系統中爲數最多。

進行3' NTR 定序時，由於RT-PCR 之上下游引子，係參考新加坡系統之序列所合成，此段定序完成之核苷酸序列不具正確性，故解讀 3' NTR 核苷酸序列，以3' 端連結 poly(A) 來完成此項工作。再以3' 端含已知個數 poly(T) 設計下游引子 polyT1，對病毒RNA 進行第一股 cDNA 合成，再根據 polyT1 部分已知序列設計下游引子(polyT2)，再以合成的 3' 端第一股 cDNA 爲模板與 polyT2 引子、ORSV-3NF 兩引子進行 PCR 增幅反應，完成 ORSV-TW 3' NTR 定序，與 ORSV-Cy1、-S1、-Cy 利用連結 poly(A) 之方式相似。ORSV-TW 之3' NTR 核苷酸序列共414 個，不具有 poly(A) 的尾端，長度較其他的tobamoviruses 長，且在3' NTR (6199-6258) 共有60 個核苷酸形成一個t-RNA 形式結構(圖三)，且此一 t-RNA 形式結構具有一個 GTG (histdine anticodon) 其功能和poly(A) 相當，可增加mRNA 的穩定性及提高轉譯的效能，並且ORSV-TW之3' NTR 有一個 tobamoviruses 具有的 24 個核苷酸保留區 (5' TCCCTCCACTTAAATCGAAGGGTT 3', 6268-6291)。ORSV-S1 之3' NTR 60 個核苷酸形式結構具有兩個 loops 與 ORSV-TW 只一個loop 有些差異[7, 10, 15]。

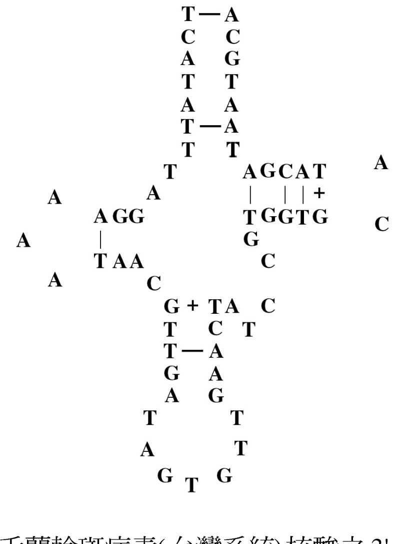
RdRp 包含 readthrough protein 和 replicase。RdRp/replicase 基因共有 3339 個核苷酸序列，可轉譯產生產生 1112 個胺基酸的 replicase 蛋白；根據數段 replicase 蛋白保留性胺基酸序列 (motif) 的存在，推測 RdRp replicase 基因轉譯之蛋白的N 端可能具有轉甲基酵素 (methyltransferase) 之活性，中間部份可能具有解螺旋酵素 (helicase) 之活性，C 端則可能具有聚合酵素 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) 之活性，因此推斷此一126 kDa 的蛋白可能爲一複製酵素 (replicase)，負有執行病毒基因體5' 端 capping 以及基因體複製的任務；183 kDa 的readthrough 蛋白，根據 4 個保留性胺基酸序列區域，推測與病毒的複合蛋白有關形成一個病毒的RNA 複製蛋白。RdRp/replicase 基因核苷酸與胺基酸序列，台灣系統 ORSV-TW、-S1、-Cy1、-U 和-Cy 相同度高達97.3 % 且轉譯的蛋白均爲126 kDa，差異性很小，且基因核苷酸序列和基因胺基酸序列相同亦高達95 % 以上。

RdRp/readthrough protein 基因共有4839 個核苷酸序列，可轉譯產生1612 個胺基酸之readthrough protin，韓國系統 ORSV-Cy 分別爲4788 個核苷酸、1595 個胺基酸與 181 kDa，和ORSV-TW、-S1、-Cy1 和 -U 基因核苷酸序、胺基酸序列與轉譯的蛋白分別爲4839 個核苷酸、1612 個胺基酸與 183 kDa 有明顯差異。但基因核苷酸序和基因胺基酸序列相同亦高達95 % 以上。

MP 基因共有912 個核苷酸序列，產生 303 個胺基酸；轉譯的移動蛋白功能與病毒基因體在感染植株體內進行移動有關；經比較後發現 MP 基因核苷酸與胺基酸序列，ORSV-TW 與 -S1 之核苷酸與胺基酸序列均爲912 個核苷酸和303 個胺基酸，且轉譯的蛋白亦爲 33 kDa；ORSV-Cy1 和-U 之核苷酸與胺基酸序列均爲840 個核苷酸和280個胺基酸，且轉譯的蛋白只有 31 kDa；ORSV-Cy 之核苷酸與胺基酸序列爲912 個核苷酸和303 個胺基酸，轉譯的蛋白爲 34 kDa (表二)。依MP 核苷酸與胺基酸序列相同度推論台灣系統ORSV-TW 與新加坡系統ORSV-S1 較相近，日本系統ORSV-Cy1 和美國系統ORSV-U 較相近；而韓國系統ORSV-Cy 與其他四個系統差異性較大。

所有系統之 CP 基因均有477 個核苷酸，轉譯成 158 個胺基酸。轉譯的鞘蛋白，具保護病毒 RNA 與辨識寄主細胞膜；而CP 基因及3' NTR 核苷酸序列通常是病毒分類上具有參考意義的區域[2, 5, 12, 14]。因此本實驗亦進行病毒五個系統其CP 基因核苷酸與胺基酸序列相同度的比對，結果顯示ORSV 不同系統，各基因比較之相同度高達97 % 以上(表三)。

根據病毒五個系統之全長度核苷酸序列、RdRp/readthrough、RdRp/replicase、MP、CP 基因核苷酸和胺基酸序列比對結果，顯示均爲相同病毒之不同系統。此結果亦可作爲判斷遺傳上歧異度之參考。因病毒之防治策略已



圖三、齒舌蘭輪斑病毒(台灣系統)核酸之3' 端非轉譯區二級結構推測圖

Fig. 3. The predicted secondary structure of the origin of assembly in the 3' NTR of ORSV-TW.

朝分子層次上發展，爲了發展有效對抗ORSV 的防治策略和分子診斷技術，分析此一病毒的遺傳變異性是必要的[1, 13]。而核苷酸序列之譯讀分析，對於基因表現的了解，以及RNA 病毒演化之親緣關係可提供明確之資料，希望藉由對基因序列的了解，期能提供蘭花病害防治管理良好之策略，並對基礎研究能產生預期效益目標。

引用文獻

1. 王惠亮、王嫦婷、廖麗貞. 2000. 核酸探針雜合反應或反轉錄聚合酶連鎖反應偵測喜姆比蘭嵌紋病毒之比較 植保會刊 42: 25-42。
2. 方鄒誠. 2002. 黑眼豇豆嵌紋病毒台灣系統基因序列之定序與分析. 國立高雄師範大學生物科學研究所碩士論文。
3. 林偉志. 2002. 蘭花喜姆比蘭嵌紋病毒台灣系統基因序列之定序與分析. 國立高雄師範大學生物科學研究所碩士論文。
4. 張清安. 1998. 植物病毒病個論(一)～蘭花病毒. 農業世界 137: 14-20。
5. Aleman-Verdaguer, M. E., Goudou-Urbino, C., Dubern, J., Beachy, R. N., and Fauquet, C. 1997. Analysis of the sequence diversity of th P1, HC, P3, NIB and CP genomic regions of several Yam mosaic potyvirus isolates: implications for the intraspecies molecular diversity of potyvirus. J. Gen. Virol. 78: 1253-1264.
6. Chang, C. A., and Pang, J. H. 1990. Preparation of antisera against cymbidium mosaic virus and odontoglossum ringspot virus and their uses in serological indexing for orchid industry in Taiwan. Plant Prot. Bull. 32:336.
7. Chng, C. G., Wong, S. M., Mahtani, P. H., Loh, C. S., Goh, C. J., Kao, M. C., Chung, M. C. and Watanabe, Y. 1996. The complete sequence of Singapore isolate of Odontoglossum ringspot virus and comparisom with other tobamoviruses. Gene 171: 155-161.
8. Dawson, W. O. 1993. Http://www.ncbi ncbi.nlm.gov/
9. Isomura, Y., Matumoto, Y., Murayama, A.,Chatani, M., Inouye, N., and Ikegami, M. 1991. Molecular cloning sequencing and expression in *Escherichia coli* of the odontoglossum ringspot virus coat protein gene. J. Gen Viro. 72: 2247-2249.
10. Ikegami, M., Isomura, Y., Matumoto, Y., Chatani, M., and Inouye, N. 1995. The complete nucleotide sequence of odontoglossum ringspot virus (Cy-1 stain)genomic RNA. J. Microbiol. Immunol. 39: 995-1001.
11. Jensen, D. D., and Gold, H. A. 1951. A virus ring spot of odontoglossum orchid symptoms, transmission and electron microscopy. Phytopathology 41: 648-653.
12. Kekarainen, T., Merits, A.,Oruetxebarria, I., Rajamaki, M. L., and Valkonen, V. J. P. T. 1999. Comparison of the complete sequences of five different isolates of potato virus A (PVA), genus *potyvirus*. Arch. Virol. 144: 2355-2366.
13. Lim, S. T., Wong, S. M., Yeong, C. Y., Lee, S. C., and Goh, C. J. 1993. Rapid detection of cymbidium mosaic virus by the polymerase chain reaction. J. Virol. Methods 41:37-46.
14. Pisi, A., Marani, F., and Bertaccini, A. 1982. Intracellular inclusions in host plants infected with Odontoglossum ringsport virus. Phytopath. Medit. 21: 27-30.
15. Ryu, K. H., and Park, W. M. 1995. The complete nucleotide sequence and genome organization of Odontoglossum ringspot tobamovirus RNA. Arch. Virol.140: 1577-1578.
16. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 5463-5467.
17. Zettler, F. W., Ko, N. J., Wisler, G. C., Elliott, M. S., and Wong, S. M. 1990. Viruses of orchids and their control. Plant Dis. 74: 621-626.

ABSTRACT

Wang, H. L.[1, 3], Wang, J. N.[1], and Chang, C. A.[2] 2004. Molecular sequencing and analysis of the viral genome of *Odontoglossum ringspot virus* Taiwan strain. Plant Pathol. Bull. 13: 97-106. ([1] Graduate Institute of Biological Science, National Kaohsiung Normal University, Kaohsiung, 800, Taiwan, [2] Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Taichung, 413, Taiwan, [3] Corresponding author, E-mail: hlwang@nknucc.nknu.edu.tw; Fax: +886-7-7169030)

Odontoglossum ringspot virus (ORSV) is a member of *Tobamovirus* genus in the family of *Tobamoviridae*. It is an important virus infecting orchid plants and occurring worldwide. The purpose of this study is to sequence the genomic regions of ORSV Taiwan strain (ORSV-TW), and to compare its nucleotide and amino acid sequences with that of four reported ORSV strains of various origins, i.e. ORSV-S1 (Singapore), ORSV-Cy1 (Japan), ORSV-Cy (Korea) and ORSV-U (America). The full length genomic RNA of ORSV-TW were 6,612 bp (accession number：AY571290）. The length of nucleotide sequences for 126/183 kDa RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) genes were 3,336 and 4,839 bp and encoded RdRp replicase and readthrough protein, respectively. Genes of movement protein (MP) and coat protein (CP) consisted of 909 and 474 nucleotides and encoded proteins of MW of 33 and 18 kDa, respectively. The nucleotide sequences of 5' and 3' non-translated regions (NTR) were 63 and 414 bp, respectively. The results of comparison between nucleotide and amino acid sequences of ORSV-TW with that of those reported ORSV strains showed more than 96% identity and similarity indicating that they are different strains of the same virus.

Key words : *Odontoglossum ringspot virus*, open reading frame, nucleotide sequence